Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 3, Fall 2020, p. 373-385

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۸۵-۳۷۳

مقاله علمی - پژوهشی

آنالیز بیوانفورماتیکی اثر پروتئین و پپتیدهای زیست‌فعال آلفا S1 کازئین شیر انسان بر مهار آنزیم ACE و مقایسه آن با گونه‌های مختلف پستانداران

حجت الله یامی[۱]- مجتبی طهمورث پور[۲]*- مرجان ازغندی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸

چکیده

فشارخون بالا یک عامل خطرناک برای بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله بیماری عروق کرونر قلب و سکته‌های مغزی محسوب می‌شود. دربدن انسان سیستمی بانام سیستم رنین-آنژیوتنسین تنظیم فشارخون را برعهده دارد که آنزیم مبدل آنژیوتنسین ACE نقش مهمی در افزایش فشارخون دارد. پپتید کازئوکینین از پروتئین آلفاS1 کازئین شیر مشتق شده است و دارای خاصیت مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش، شناسائی پروتئین آلفاS1 کازئین و پپتیدهای زیست‌فعال مهارکننده آنزیم ACE در شیر انسان و همچنین مقایسه آن با چند گونه مختلف از پستانداران می‌باشد. جمع‌آوری داده‌های ژنومی و پروتئینی برای هشت گونه مختلف پستانداران(گاو، گوسفند، شتر، اسب، انسان، گاومیش و خوک) از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) صورت گرفت و پس از آن پیش‌بینی پپتیدهای زیست‌فعال پروتئین آلفاS1 کازئین و ساختار سه‌بعدی آن‌ها با کمک نرم افزارهای آنلاینI-TASSER،ACCLUSTERServer و GalaxyWEB انجام شد. شبیه‌سازی برهمکنش (داکینگ) پروتئین‌های آلفاs1کازئین و پپتیدهای زیست‌فعال کازئوکینین با آنزیم مهارکننده آنژیوتنسین ACE در درون سلول با استفاده از نرم‌افزار آنلاینClusPro2.0 انجام شد. نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی پروتئین آلفاS1 کازئین شیر انسان با سایر پستانداران نشان داد که شیر "شتر" از لحاظ خواص فیزیکوشیمیائی شبیه‌ترین شیر به انسان است. همچنین در بررسی برهمکنش مولکولی این پروتئین و پپتیدهای زیست‌فعال آن درهشت گونه مختلف از پستانداران مشخص شد که شیر "شتر" بعد از شیر انسان بیشترین عملکرد در مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون را دارد. با توجه به شباهت ساختار این پپتید در پروتئین آلفاS1 کازئین شیر انسان و شتر در کنار خاصیت ضدفشار خونی آن می‌توان شیر شتر را به‌عنوان جایگزین مناسب برای شیر انسان در تغذیه و کمک به درمان فشارخون و بیماری‌های قلبی بیماری معرفی کرد. همچنین از این پپتید می‌توان به‌عنوان افزودنی‌های غذایی فراسودمند و طبیعی، جایگزین مناسب برای داروهای سنتزی ضدفشارخون استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم مبدل آنژیوتنسینACE، برهمکنش مولکولی، پروتئین آلفا s1 کازئین

مقدمه

فشار خون بالا یک عامل خطرناک برای بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله بیماری عروق کرونر قلب و سکته‌های مغزی محسوب می‌شود. در بدن انسان سیستمی با نام سیستم رنین- آنژیوتنسین تنظیم فشار خون را بر عهده دارد. آنژیوتنسین-I پروتئینی است که از پیشسازی با نام آنژیوتنسینوژن در کبد ساخته و به خون رها می‌شود. در خون آنزیم رنین این پیش ساز را به آنژیوتنسین -I تبدیل می‌کند. آنژیوتنسین -I وارد شش شده و در آنجا بوسیله آنزیم ACE به آنژیوتنسین -II یعنی شکل فعال‌تر آن تبدیل می‌شود. آنزیم‌های آنژیوتنسین-I و II قطر عروق خونی را کاهش می‌دهند و بدین ترتیب فشار خون را بالا می‌برند. بنابراین هر ترکیبی که بتواند از فعالیت این سیستم یا آنزیم ACE جلوگیری کند به درمان فشار خون کمک می‌نماید (۵ و ۱۱). شیر به عنوان یک ماده غذائی ارزشمند، تأمین کننده مواد مغذی مورد نیاز برای سلامت بدن از جمله کلسیم، فسفر، پروتئین و ریبوفلاوین می‌باشد. شیر غنی از پروتئین‌هایی با کیفیت بالا می‌باشد که دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای، عملکردی و بیولوژیکی بی نظیری هستند (۲۰). پروتئین های ویژه شیر شامل ۴ کازئین (آلفا S1، آلفاS2 ، گاما و کاپا) و ۲ آب پنیر (آلفا لاکتالبومین و بتا لاکتوگولبولین) می‌باشد که از این میان کازئین یکی از پروتئین‌های اصلی شیر می‌باشد که حدود ۸۰ درصد از کل پروتئین‌های شیر را به

۱و۳- دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲-استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- ایمیل نویسنده مسئول: m_tahmoorespur@yahoo.com)
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.74332

خود اختصاص می‌دهد (۱۴، ۱۸، ۲۴). پژوهش‌های متعددی بـر روی ژن کازئین در پستانداران انجام شده است، اما هیچ کدام نقش آن در کاهش فشار خون را مورد بررسی قرار نداده انـد (۲ ،۱۵ ،۱۸، ۲۴). از طرفی، پروتئین آلفا s1 کازئین یکی از پروتئین‌های خـانواده کـازئین می‌باشد که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای بالا، دارای ویژگی‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی از جمله کاهش فشار خون و مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE)[1] می‌باشد (۱).

پپتیدهای زیست فعـال[2] در تـوالی پـروتئین اصـلی بصـورت غیرفعال قرار دارند و طی هضم شیر در دستگاه گوارش یا تخمیر شیر توسط باکتری‌های پروتئولیتیـک و یـا هیـدرولیز توسـط آنـزیم‌هـای پروتئولیتیک آزاد می شوند. بسـیاری از ایـن پپتیـدها دارای چنـدین فعالیت زیستی هستند. کازئین موجود در شیر یا سایر فرآورده‌های لبنی مثل پنیر منبع غنی پپتیدهای زیست فعال هستند. پپتیدهای بدسـت آمده از کازئین از قبیل پپتیدهای اپیوئیدی، پپتیدهای ضد پرفشـاری خـون[3]، کـازئین فسـفوپپتیدها و گلیکوماکروپپتیـدها نقـش‌هـای فیزیولوژیکی گوناگونی از جمله مهم‌ترین آن تنظیم و کـاهش فشـار خون از طریق مهار آنزیم ACE ایفا می‌کنند (۲۵ و ۲۷).

تحقیقات نشان داده است که پپتیدهای مشتق شده از پروتئین کازئین آلفاS1 شیر، با نام کازئوکینین[4] دارای خاصـیت مهـار آنـزیم ACEو کاهش فشار خون می‌باشد (۸ و ۱۷). مطالعات زیادی بر روی رابطه ی بین ساختار و فعالیـت مهـار آنـزیم ACE پپتیـدهای مهـار کننده‌ی این آنزیم انجام شده است. این مطالعات نشان می‌دهـد کـه انتهای Cاین پپتیدها نقش مهمی در اتصال آنها به آنزیم ACE دارد. همچنین این بررسی‌ها نشان می‌دهد که این پپیتیدها در انتهـای C خود دارای آمینواسیدهای آبگریز ماننـد تریپتوفـان، تیـروزین، فنیـل آلانین و پرولین هستند و توانایی بالایی در مهار آنزیم ACE از خود نشان می‌دهند (۱۳).

هدف از انجام این پژوهش، شناسائی پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE) در شیر انسان و همچنین مقایسه آن با گونه‌های مختلف از پستانداران بود.

مواد و روش

جمع‌آوری داده‌های ژنومی و پروتئینی

پـروتئین آلفـا s1 کـازئین توسـط ژن CSN1S1 در موجـودات مختلـف کدگـذاری شـده اسـت. جـدول ۱ تـوالی نوکلئوتیـدی ژن CSN1S1و جدول ۲ توالی اسـیدآمینه پـروتئین آلفـا s1 کـازئین در هشت گونه مختلف از پستانداران (گاو، گوسفند، شتر، اسب، انسـان، گاو میش و خوک) را نشان می‌دهد که از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (WWW.NCBI.COM) استخراج شده‌اند. توالی‌های استفاده شده در این پژوهش اکثر از نوع توالی‌های مرجع[5] می‌باشـند که بلندترین و کوتاه ترین قطعه پپتیدی به ترتیب مربوط به خوک و انسان می‌باشد.

خواص فیزیکوشیمیایی

آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر، آب‌دوسـتی و آب‌گریزی و همچنین بارالکتریکی و PH اسید آمینه‌های پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین در هشت گونه مختلف از پستانداران با استفاده از نـرم افـزار CLC Main Workbench 5 انجام شد.

مقایسه هم ردیف توالی‌های پروتئین

مقایسه هم ردیف[6]توالی‌های پروتئین آلفا s1 کازئین برای هشت گونـه مختلـف از پسـتانداران بـا اسـتفاده نـرم افـزار CLC Main Workbench 5انجام شده است.

پیش بینی و مقایسه هم ردیف پپتید زیسـت فعـال در ۸ گونـه مختلف از پستانداران

ابتدا با بررسی سوابق تحقیق، توالی پپتیدهای ثبت شده برای کازئوکینین از مقالات مختلف اسـتخراج شـد (۷، ۱۱ و ۱۹) و سـپس براسـاس آنالیزهـای بیوانفورمـاتیکی در نـرم افـزار CLC Main Workbench 5 و همچنـین بـا اسـتفاده از نـرم افزارهـای آنلایـن SPRINT، PeptiMap Server و ACCLUSTER Server جایگاه‌های فعال پروتئین ها که احتمال تبدیل شدن به یـک پپتیـد زیست‌فعال را دارد برای هر هشت گونه مختلف از پستانداران شناسائی گردید و در پایان فایل PDB برای تمامی توالی‌های پپتیدی با استفاده از نرم افزار PYMOL تهیه و ذخیره شد (۲۹).

پیش بینی و مقایسه ساختار سه بعدی

ساختار سوم(سه بعدی) پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین با استفاده از روش بندکشی شده (Threading) پیش بینی شد. براساس این روش پس از استخراج توالی‌های اسـیدآمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین، سـاختار سه بعدی پروتئین‌ها و پپتیـدهای مـورد نظـر بـرای هشـت گونـه از پسـتانداران بـا اسـتفاده از نـرم افـزاری آنلایـن I-TASSER و

1- Angiotensin Converting Enzyme
2- Bioactive Peptides
3- Antihypertensive Peptides (ACE Inhibitors)
4- Casokinins
5- Refrence Sequences
6- alignment

GalaxyWEB پیش بینی و برای بررسی پایداری پروتئین و پپتیدها در شرایط دینامیکی (شرایط درون سلول) از نرم افزارهای آنلاین 3Drefine و YASARA Energy Minimization استفاده گردید (۲۳، ۲۵، ۳۰ و ۳۲).

جدول۱– طول توالی نوکلئوتیدی ژن CSN1S1 و شماره دسترسی آن در بانک اطلاعاتی

Table 1- Nucleotide sequence length of CSN1S1 gene and its access number in the database

گونه پستاندار Mammalian species	طول توالی Sequence Length	شماره دسترسی بانک اطلاعاتی Database Access Number
BOSگاو	645 bp	NM_181029
CAPRAبز	642 bp	NM_001285695
OVISگوسفند	633 bp	NM_001009795
CAMELUSشتر	669 bp	NM_001303566
EQUASSاسب	639 bp	NM_001081883
HOMOانسان	567 bp	NM_001890
BUBALUSگاو میش	633 bp	FJ392261
CAVIAخوک	668 bp	XM_023564129

جدول۲– طول توالی اسید آمینه پروتئین آلفا s1 کازئین و بانک اطلاعاتی استخراج شده

Table 2- Sequence Length of the amino acid sequence of alpha protein s1 casein and extracted database

گونه پستاندار Mammalian species	طول توالی Sequence Length	شماره دسترسی بانک اطلاعاتی Database Access Number
BOSگاو	214 aa	NP_851372
CAPRAبز	213 aa	NP_001272624
OVISگوسفند	206 aa	NP_001009795
CAMELUSشتر	222 aa	NP_001290495
EQUASSاسب	212 aa	NP_001075352
HOMOانسان	185 aa	NP_001881
BUBALUSگاو میش	206 aa	ACJ14317
CAVIAخوک	251 aa	XP_023419897

سپس برای ارزیابی دقت پیش بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله در نرم افزار آنلاین(RAMPAGE (Ramachandran Plot Analysis و SAVES v5.0 مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت بهترین ساختارهای پیش بینی شده انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی برهمکنش پروتئین‌ها (داکینگ)

برای بررسی اثرات متقابل پروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین با آنزیم ACE و همچنین شبیه سازی این برهمکنش‌ها در درون سلول از نرم افزار آنلاینClusPro2.0 (/https://cluspro.bu.edu) استفاده شد و با توجه به شرایط مختلف از جمله موقعیت مناسب و حداقل انرژی مورد نیاز برای اتصال پروتئین‌ها، نتایج برای انتخاب بهترین اتصال مورد بررسی قرار گرفتند (۴). همچنین فایل PDB آنزیم مبدل آنژیوتنسین ACE (با شماره دسترسی 1O8A) برای بررسی اثرات متقابل آن با پروتئین و پپتیدهای آلفا s1 کازئین از سایت PDB [1] استخراج شد. با بررسی منابع مختلف جایگاه فعال[2] آنزیم ACE که شامل قطعه ۳۲ اسید آمینه‌ای با توالی (HEMG….. EAIGD) استخراج شد (۶).

نتایج و بحث

آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی

آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر، آب دوستی و آب گریزی و همچنین بارالکتریکی و PH اسید آمینه‌های پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین در هشت گونه مختلف از پستانداران در جداول شماره ۳ و ۴ آورده شده است.

همانطور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود، از لحاظ مقایسه خواص فیزیکوشیمیائی بین پروتئین شیر انسان با سایر

1-Protein Data Bank
2-Active Site

پستانداران، بیشترین تشابه مربوط به شیر"شتر"و کمترین آن مربوط به شیر"گاو میش"می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت شیر شتر از لحـاظ خواص فیزیکوشیمیائی شبیه‌ترین شیر به انسان بوده و می‌تواند منبع جایگزین مناسبی برای شیر انسان در تغذیه کودکان باشد.

تحقیقات لی و همکاران (۲۰۰۴)، نشان می‌دهد اتصال پپتیدها به آنزیم مبدل آنژیوتنسین وابسته به انتهای کربوکسـیل پپتیـد اسـت و پپتیدهای دارای اسیدآمینه‌های آبگریز در این بخش مهارکننـده‌هـای قوی‌تری می‌باشند. این اسیدآمینه‌ها در حققیت با جایگاه فعال آنـزیم بـرهمکنش مـی‌دهنـد. از طرفـی ایـن تحقیقـات خبـر از مؤثربـودن اسیدآمینه بیشتر تریپتوفان، شامل آروماتیک‌هـای تـایروزین و فنیـل الانـین و همچنـین پـرولین بـرای بـرهمکنش مـی‌دهنـد. نسـبت آمینواسیدهای آبدوست/آبگریز در توالی پپتیدها نقش کلیدی در میزان فعالیت بازدارندگی ایفا می‌کند زیرا آمینواسیدهای آبدوست دسترسـی پپتید به سایت فعال آنزیم را محدود می‌سازند (۱۲).

با بررسی خواص فیزیکوشیمیائی پروتئین‌های آلفا s1 کـازئین و پپتیدهای زیست فعـال کـازئوکینین بـرای هشـت گونـه مختلـف از پستانداران، مشخص شد که بیشترین فراوانی اسیدآمینه‌های تیروزین و پرولین که سبب ایجاد خاصـیت آبگریـزی در پـروتئین و پپتیـدها می‌شود مربوط به شیر "شتر، گاو و گاومیش" و کمترین آن مربوط به "گوسفند و بز" می‌باشد که نشان می‌دهد خاصیت ضد فشار خـون و مهارکنندگی فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE) در شیر این گونه از پستانداران بیشتر از سـایرین مـی‌باشـد. زیـرا بـا توجـه بـه نتـایج آزمایشگاهی در تحقیقات لی و همکاران (۲۰۰۴) نشان داده شده است که اسید آمینه‌های آبگریز مانند تریپتوفان، تیروزین، فنیـل آلانـین و پرولین توانایی بالایی در مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون دارد (۱۲).

جدول۳- مقایسه خواص فیزیکوشیمیائی پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین در ۸ گونه از پستانداران

Table 3- Comparison of the physico-chemical properties of alpha-s1 protein casein and Casokinin peptide in 8 species of mammals

آنالیز analyze	انسان HOMO		گاو BOS		بز CAPRA		گوسفند OVIS		شتر CAMELUS		گاو میش BUBALUS		اسب EQUASS		خوک CAVIA	
	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein
وزن Weight(kDa)	1.1	21.6	0.6	24.5	0.9	24.1	0.9	23.3	1.1	25.8	0.6	23.4	0.8	25.3	1	28.9
نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	5.5	5.5	5.2	5.18	9.9	5.28	9.9	5.67	5.5	5.23	5.7	5.9	5.6	6.24	3.4	7.8
نیمه عمر half time	2.8	30	5.5	30	1.3	30	1.3	30	2.8	30	5.5	30	0.8	30	2.8	30
وضعیت‌آبدوستی Hydrophilic	5	66	2	55	3	63	3	56	5	59	2	54	3	61	4	70
وضعیت‌آبگریزی Hydrophobic	3	75	4	101	3	100	3	99	4	97	4	304	3	84	3	120

با توجه به نتایج تحقیق یاماموتو و همکاران (۱۹۹۴)، وجود اسید آمینه پرولین در پپتیدهای مؤثر بر فشار خون بسیار ضروری می‌باشد. زیرا این پپتیدها می‌بایست در برابر آنزیم‌های هضمی در معده مقـاوم باشند تا به روده رسیده و از آن طریق جذب شوند و فعالیت‌های مهار آنزیم ACE را انجام دهند که وجود اسیدآمینه پرولین در ساختار این پپتیدها سبب پایداری آنها در برابر آنزیم‌های هضمی می‌گردد (۳۱).

از این رو براساس جدول شماره ۴، از میان پپتیدهای زیست فعال شناسائی و پیش بینی شده در هشت گونه از پستانداران مورد مطالعه ما، کازئوکینین مربوط به شیر "شتر" به دلیل داشتن پـرولین بیشـتر نسبت به سایر گونه‌ها از پایداری بیشتری برخوردار می‌باشد. بنابراین خاصیت ضدفشار خون بیشتری نسـبت بـه سـایر پسـتانداران دارد و کازئوکینین اسب به دلیل نداشتن پـرولین دارای کمتـرین مقاومـت و پایداری بوده و احتمال هیدرولیز آن در محیط معده بسیار بالاست.

همچنین نتایج حاصله از آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی پـروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین برای هشت گونه مختلف از پستانداران نشان می‌دهد که در محیط با PH پـایین فعالیت پروتئین و پپتیدهای انسان بیشتر از سایر گونه‌های می‌باشد.

مقایسه هم ردیف توالی‌های پروتئین

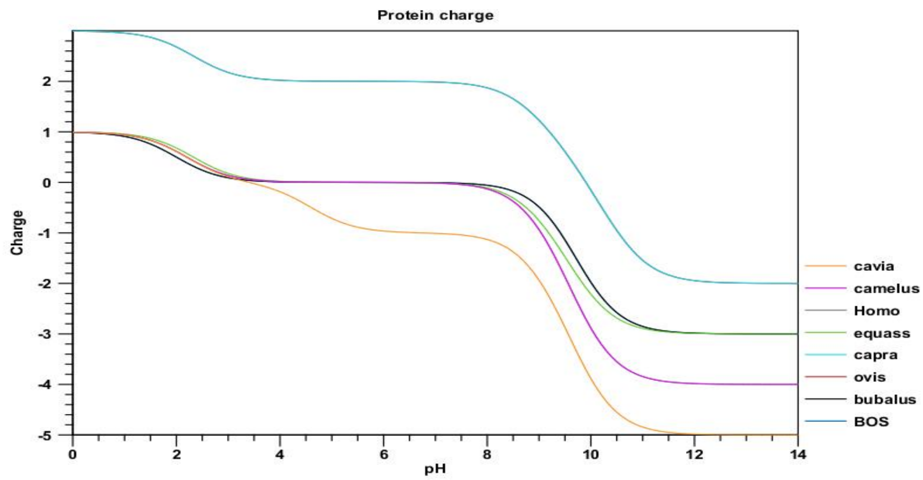
براساس آنالیز بیوانفورماتیکی مشخص شد که بیشـترین درصـد تشابه توالی اسیدآمینه پروتئین آلفا s1 کازئین در پستانداران مختلف با انسان مربوط به اسب و شـتر و کمتـرین درصـد تشـابه مربـوط بـه گاومیش و بز است. مقایسه هم ردیف تـوالی‌هـای پـروتئین آلفـا s1 کازئین برای هشت گونه مختلف از پستانداران جدول شماره ۵ نشان

داده شده است.

جدول٤– مقایسه وضعیت اسیدآمینه در ۸ گونه از پستانداران

Table 4- Comparison of amino acid status in 8 species of mammals

اسید آمینه Amino Asid	انسان HOMO		گاو BOS		بز CAPRA		گوسفند OVIS		شتر CAMELUS		گاو میش BUBALUS		اسب EQUASS		خوک CAVIA	
	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein
آلانین Alanine	-	12	1	12	-	15	-	14	-	9	1	12	1	13	-	19
سیتونین Cysteine	-	4	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	6
آسپارتیک‌اسید Aspartic Aasid	-	3	-	7	-	7	-	7	-	12	-	7	-	7	-	6
گلوتامیک اسید Glutamic Aasid	-	20	-	25	-	20	-	19	-	24	-	20	-	25	1	18
فنیل آلانین Phenilalanine	-	4	1	8	-	7	-	6	-	5	1	8	1	6	-	10
گلایسین Glycine	-	1	-	9	-	9	-	9	-	6	-	11	-	٠	1	6
هیستیدین Histidine	-	3	-	5	-	4	-	4	-	5	-	4	-	7	-	13
ایزولوسین Isolecsine	1	8	-	12	-	9	-	12	-	12	-	12	-	13	-	8
لیزین Lysine	-	6	-	15	2	13	2	15	-	14	-	12	-	15	-	9
لوسین Lecsine	-	17	1	22	1	22	1	22	-	23	1	22	1	22	-	27
متیونین Methionine	1	8	-	6	-	6	-	6	1	5	-	7	-	5	-	9
آسپارژین Asparagine	-	15	-	8	1	12	1	10	-	7	-	7	-	8	-	7
پرولین Proline	1	14	1	17	1	19	1	17	2	19	1	18	-	14	1	23
گلوتامین Glutamine	2	17	-	14	1	14	1	14	2	15	-	17	1	22	1	26
آرژنین Arginine	-	12	-	6	-	6	-	6	-	11	-	5	-	13	-	15
سرین Serine	-	16	-	16	-	18	-	18	-	16	-	14	-	14	-	16
نین[ترئو Teronine	-	5	-	6	-	7	-	4	-	9	-	5	-	6	-	8
والین Valine	-	9	-	13	1	11	1	11	1	1	-	1	-	1	1	16
تریپتوفان Tryptophan	-	2	-	2	-	2	-	2	-	3	-	2	-	2	-	2
تیروزین Tyrosine	3	9	2	10	1	11	1	9	3	11	2	10	2	10	3	7



شکل ۱- بارالکتریکی و PH پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین در ۸ گونه پستانداران

Figure 1- Charge and pH of alpha-protein s1 casein and Casokinin peptide in 8 species of mammals

جدول ۵- درصدتشابه و اختلاف اسیدآمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین در ۸ گونه مختلف از پستانداران

Table 5- Similarity and difference of amino acid content in Protein Alpha-s1 Casein in 8 Mammalian Species

		1	2	3	4	5	6	7	8
BOSگاو	1		55	40	72	256	254	347	398
BUBALUSگاومیش	2	91.63		78	86	280	272	356	410
CAPRAبز	3	93.80	88.13		49	253	259	340	403
OVISگوسفند	4	89.04	89.91	92.54		285	288	331	384
CAMELUSشتر	5	62.90	59.77	63.33	62.02		218	319	407
EQUASSاسب	6	62.09	59.70	61.34	57.71	67.56		296	385
HOMOانسان	7	49.12	47.95	49.39	50.52	53.43	54.95		412
CAVIAخوک	8	46.36	45.41	45.69	47.18	45.37	46.97	42.22	

پیش بینی و مقایسه هم ردیف پپتید زیست فعال در ۸ گونه مختلف از پستانداران

از طریق بررسی منابع موجود، توالی پپتید کازئوکینین برای سه پستاندار (انسان، گاو و گوسفند) استخراج و براساس موقعیت قرارگیری آن‌ها برای سایر گونه‌های پستانداران توالی پپتیدی پیش بینی شد و با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی ساختار سه بعدی توالی‌های مورد نظر پیش بینی گردید و از میان ساختارهای مورد نظر بهترین پیش بینی براساس حداقل انرژی و شرایط دینامیکی انتخاب گردید و بصورت فایل PDB برای آنالیزهای پپتیدی ذخیره شد. توالی‌های پپتیدی کازئوکینین در گونه‌های مختلف پستانداران در جدول شماره ۶ نشان داده شده است.

براساس مقایسه هم ردیف پپتید کازئوکینین، بیشترین شباهت پپتید کازئوکینین با انسان مربوط به شتر (۷۸ درصد) و کمترین شباهت مربوط به اسب می‌باشد(۹درصد) که در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.

پیش بینی و مقایسه ساختار سه بعدی

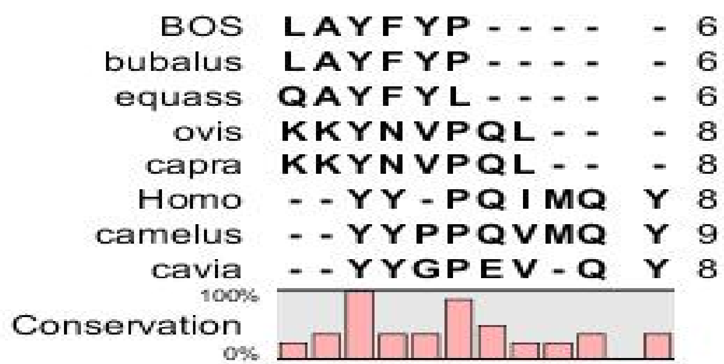
با استفاده نرم افزارهای آنلاین I-TASSER و GalaxyWEB براساس توالی‌های اسیدآمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین استخراج شده برای تمامی گونه‌های مختلف از پستانداران ساختار سه بعدی پیش بینی گردید. سپس برای ارزیابی دقت پیش بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله از نرم افزار آنلاین RAMPAGE (Ramachandran Plot Analysis) استفاده شد.

طبق این نرم افزار، تمامی اسید آمینه های موجود در ساختار سه بعدی پروتئین و پپتید های پیش‌بینی شده در نواحی مختلف مورد ارزیابی قرار می گیرند و در صورتی که درصد دقت تخمین ساختار مورد نظرد بالای ۹۰ درصد باشد می توان گفت که ساختارهای پیش بینی شده از دقت کافی برای استفاده در آنالیز داکینگ مولکولی برخوردار می باشد.

جدول٦- پپتیدهای موثر بر کاهش فشار خون در ساختار ثانویه کازئین در ۸ گونه از پستانداران

Table 6- Antihypertensive peptides in the secondary structure of casein in 8 species of mammals

گونه Species	نام پپتید peptide name	توالی پپتیدی Peptide sequence	قطعه اسیدآمینه Amino acid segment	منابع References
(homo)گاو	Casokinins	136-143	YYPQIMQY	13
(bos)انسان	Casokinins	142-147	LAYFYP	19
(ovis)گوسفند	Casokinins	102-109	KKYNVPQL	8
(bubalus)گاو میش	Casokinins	142-147	LAYFYP	Predicted in this study
(capra)بز	Casokinins	102-109	KKYNVPQL	Predicted in this study
(equass)اسب	Casokinins	142-147	QAYFYL	Predicted in this study
(camelus)شتر	Casokinins	136-143	YYPPQVMQY	Predicted in this study
(cavia)خوک	Casokinins	136-143	YYGPEVQY	Predicted in this study



شکل۲- مقایسه هم ردیف پپتید کازئوکینین در ۸ گونه از پستانداران

Figure 2- Multiple sequence alignment of Casokinin peptide in 8 species of mammals

نتایج دقت ساختار پروتئین و پپتیدهای مورد نظر در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصله می‌توان پیش بینی کرد که آرایش فضائی (ساختار سه بعدی) پروتئین و پپتیدهای اثر زیادی برخاصیت ضد فشار خون آن‌ها خواهد داشت بطوریکه ساختار صحیح از پروتئین یا پپتید باعث می‌شود تا برهمکنش مناسبی (اتصال قوی با جایگاه فعال آنزیم ACE) ایجاد شود و در نتیجه آن مهار آنزیم ACEوکاهش فشار خون را به دنبال خواهد داشت.

بررسی برهمکنش (داکینگ) پروتئین‌ها و پپتیدهای شناسائی شده با آنزیم ACE

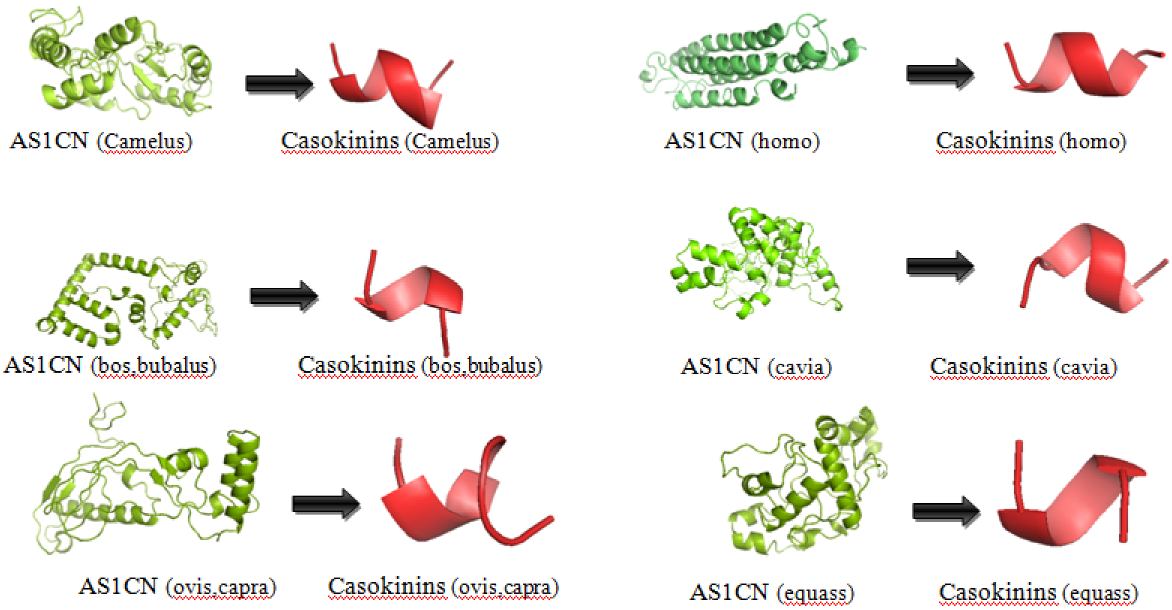
بررسی عملکرد پروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای کازئوکینین شناسائی شده برای هشت گونه مختلف از پستانداران و مقایسه نتایج آن با شیر انسان در مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مختص داکینگ پروتئین–پروتئین نظیر نرم افزار آنلاین ClusPro2.0 صورت گرفت.

براین اساس میزان انرژی و موقعیت اتصال پروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای کازئوکینین با آنزیم ACE مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج براساس فرمول زیر در جدول زیر نشان داده شده است (۹ و ۱۰).

$$E = 0.40E_{rep} \pm 0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$$

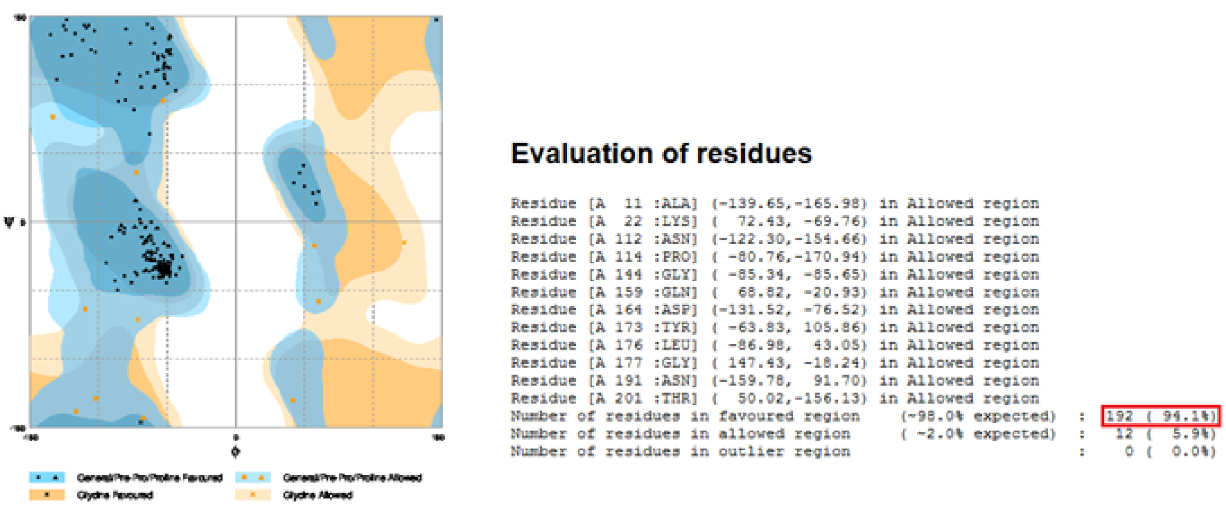
نتایج بررسی موقعیت و انرژی اتصال نشان می‌دهد که مناسب‌ترین موقعیت اتصال که در آن پروتئین و پپتید کازئوکینین با بیشترین انرژی به جایگاه فعال آنزیم متصل شده است مربوط به شیر انسان است و در مقایسه با سایر پستانداران، شیر "شتر" از لحاظ این خاصیت بسیار به شیر انسان نزدیک می‌باشد. همچنین این نتایج تأیید می کند که ساختار سه بعدی پروتئین و پپتیدهای مورد نظر در قدرت اتصال آن‌ها با جایگاه فعال آنزیم ACE موثر بوده است زیرا شکل فضایی پپتید کازئوکینین در انسان و شتر بسیار مشابه است و این

تشابه در ساختار ضایی بخوبی در نتایج حاصل از داکینـگ مولکـولی مشاده می شود. بنابراین براساس نتایج بیوانفورماتیکی می‌توان پیش بینی کرد که شیر "شتر" بعد از شیر انسان بیشترین عملکرد در مهار آنزیم ACE را خواهد داشت اما اثبات ایـن موضـوع نیـاز بـه انجـام آزمایشات تکمیلی دارد.



شکل ۳ – ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین

Figure 3- The predicted three-dimensional structure for alpha-protein s1 casein and Casokinin peptide



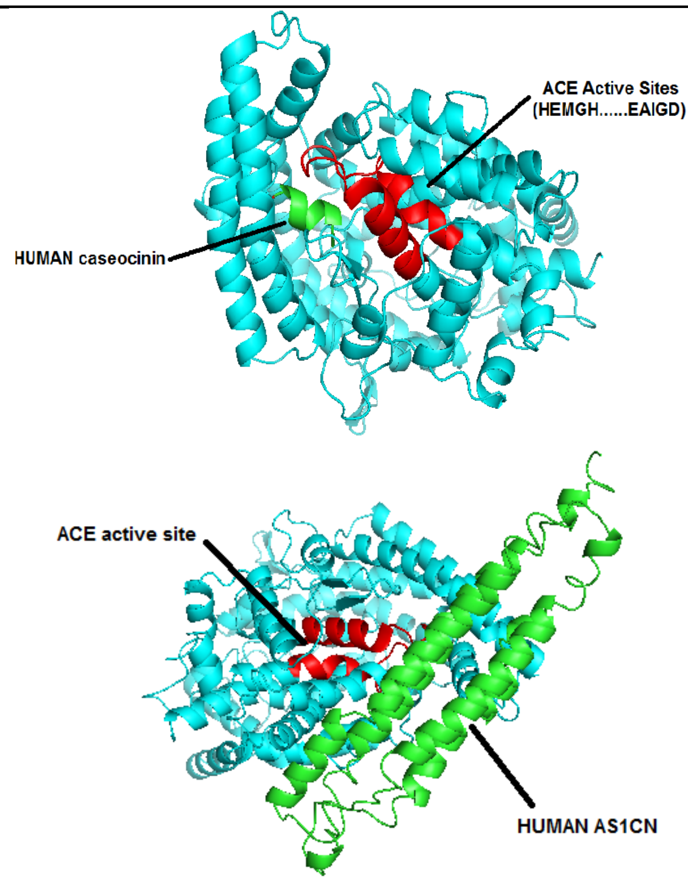
شکل ٤ – بررسی نتایج ساختار سه بعدی پروتئین و پپتیدها پیش بینی شده در پلات راما-چاندران

Figure 4- The results of three-dimensional structure of protein and peptides predicted in the Rama-Chandran Plate

جدول۷- مقایسه انرژی اتصال برای برهمکنش‌های پروتئین و پپتیدهای در ۸ گونه مختلف پستانداران

Table 7- Comparison of binding energy for protein and peptide interactions in 8 different mammalian species

گونه Species	- Δ G (kcal/mol)	
	Isracidin	AS1CN
(homo)انسان	-631.4	-850.4
(bos)گاو	-563.5	-777.6
(ovis)گوسفند	-378.3	-904
(bubalus)گاو میش	-563.5	-778.2
(capra)بز	-378.3	-827.3
(equass)اسب	-555.6	-825.9
(Camelus)شتر	-659.7	-808.6
خوک(cavia)	-492.5	-859



شکل۵- موقعیت‌فضائی‌برهمکنش‌پروتئین‌آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین انسان با جایگاه فعال آنزیمACE

Figure 5- Situation of the interaction between proteins αs1 and casein and human Casokinin peptide with Active site of the ACE enzyme

پس درنهایت با توجه به نتایج بیوانفورماتیکی می‌توان پیش بینی نمود که پروتئین آلفا s1 کازئین و محصولات حاصل از هیدرولیز

آن(پپتید زیست فعال کازئوکینین) از طریق کاهش عوامل خطر ساز بروز بیماری‌های قلبی عروقی از قبیل مهار فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتنسین(ACE) و فشار خون در پیشگیری از بروز و پیشرفت بیماری‌های قلبی عروقی نقش دارند و از میان شیر پستانداران بالاترین خاصیت مربوط به شتر می‌باشد و با توجه به شباهت آن با شیر انسان می‌تواند منبع مناسبی برای تغذیه انسان باشد.

نتیجه‌گیری کلی

پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین به دلیل خواص بیولوژیکی فراوان و از جمله آن خاصیت ضد فشار خون و مهار آنزیم ACE در سلامتی بدن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. پپتید زیست فعال کازئوکینین دارای ترکیبات داروئی می‌باشد که می‌تواند در درمان فشار خون و بیماری‌های قلبی مورد استفاده قرارگیرد. همچنین براساس نتایج حاصل از این پژوهش بر روی پپتیدهای کازئوکینین در موجودات مختلف مشخص شد که شیر شتر دارای بالاترین خاصیت ضد فشار خون و مهار آنزیم ACE بوده و به دلیل بالا بودن شباهت ساختاری این پروتئین در شیر شتر با شیر انسان، می‌تواند منبع جایگزین مناسبی برای تغذیه انسان باشد. بنابراین پپتیدهای کازئوکینین می‌توانند به عنوان افزودنی‌های غذایی فراسودمند و طبیعی، جایگزین مناسبی برای داروهای سنتزی ضد فشار خون باشند.

منابع

1. Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. Journal of Nutrition, 134(4): 89-95.
2. Alinaghizadeh, R., M. R. Mohammad Abadi, And S. Moradnasab Badrabadi. 2007. Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bos indicus) using PCR-RFLP. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10 (23): 4291-4294.
3. Bhattacharya, D., J .Nowotny., R. Cao, And J .Cheng. 2016. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. Nucleic Acids Research, 8(44): 406-409.
4. Comeau, S. R., D. W. Gatchell., S. Vajda, And C. J. Camacho. 2004. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. Bioinformatics, 20(1): 45-50.
5. Cordopatis, P. 2004. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. Current Topics in Medicinal Chemistry, 4(1): 403-429.
6. Georgios, A., G. Spyroulias., S. Athanassios., P. George., M. Z. Evy, and C. Paul. 2004. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. Current Topics in Medicinal Chemistry, 4(3): 403-429.
7. Gomez-Ruiz, J. A., M. Ramos, And I. Recio. 2002. Angiotensinconverting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. International Dairy Journal, 12(8): 697–706.
8. Hata, Y., M. Yamamoto., M. Ohni., K. Nakajima., Y. Nakamura, And T. Takano. 1996. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. American Journal of Clinical Nutrition, 64(5): 767-771.
9. Kozakov, D., D. Beglov,. T. Bohnuud,. S. Mottarella,. B. Xia., D. Hall, And R .S. Vajda. 2013. How good is automated protein docking?. Journal of Proteins, 8(12): 2159-2166.
10. Kozakov, D., D. R. Hall., B. Xia., K. A. Porter., D. Padhorny., C. Yueh., D. Beglov, And S. Vajda. 2017. The ClusPro web server for protein-protein docking. Nature Protocols, 12(2): 255-278.
11. Kim, Y. K., S. Yoon., D. Y. Yu., B. Lönnerdal, And B. H. Chung. 1999. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human αs1-casein expressed in Escherichia coli. Journal Dairy Research, 66(4): 431–9.
12. Li, G. H., G. W. Le,. Y. H. Shi, And S. Shrestha. 2004. Angiotensin I–converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteinsand their physiological and pharmacological effects. Nutrition Research, 24(7): 469-486.
13. Nakamura, Y., N. Yamamoto., K. Sakai., A. Okubo., S. Yamazaki, And T. Takano. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. Journal Dairy Science, 78(4): 777-783.
14. Madureira, A. R., C. I. Pereira., A. Gomes., M. E. Pintado, And M. F. Xavier. 2007. Bovine whey proteins-Overview on their main biological properties. Food Research International, 40(10): 1197-211.
15. Mahmoodi, M., A. Ayatollahi, And M. R. Mohammadabadi. 2018. Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. Journal of Agricultural Biotechology, 9(3): 119-128.
16. Miller, G. D., J. K. Jarvis, And L. D. McBean. 2007. Handbook of dairy foods and nutrition. 3rd Edition. CRC press: Taylor & Francis group, 6: 1-55.

17. Mizuno, S., K. Matsuura., T. Gotou., S. Nishimura., O. Kajimoto, And M. Yabune. 2005. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. British Journal of Nutrition, 94(1): 84-91.
18. Mohammadi, A., M. R. Mohammadabadi, H. Mirzaei., A. Baghizadeh., O. Dayani., M. Asadi Fozi, And V. Bahrampoor. 2009. Study of Kappa Casein gene of local and Holstein dairy cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 16 (2): 125-132.
19. Pihlanto, A, And H. Korhonen. 2005. Bioactive peptides and proteins. International Dairy Journal, 16(9): 945-960.
20. Playne, M., L. Bennett, And G. Smithers. 2003. Functional dairy foods and ingredients. Aust J Dairy Technol, 58(3):242-64.
21. Restani, p., C. Ballabio,. C. Di Lorenzo., S. Tripodi, And A. Fiocchi. 2009. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. Analitical and Bioanalitical chemistry,395(1): 47-56.
22. Rival, S. G., C. G. Boeriu, And H. J. Wicher. 2000. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties Peroral calcium dosage of infants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(1): 295–302.
23. Roy, A., A. Kucukural, And Y. Zhang. 2010. a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols, 5(4): 725-738.
24. Sulimova, G. E., M. A. Abani., J. Rostamzadeh., M. R. A. Mohammad, And O. E. Lazebnyĭ. 2007. Allelic polymorphism of kappa-casein gene (CSN3) in Russian cattle breeds and its informative value as a genetic marker. Genetika, 43(1): 88-95.
25. Shah, N. P. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. British Journal of Nutrition, 84(1): 3-10.
26. Shin, W. H., G. R. Lee., L. Heo., H. Lee, and C. Seok. 2014. Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY protein modeling programs. BioDesign - Nature Science, 2(1): 1-11.
27. Suetsuna, K., H. Ukeda, And H. Ochi. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. Journal Nutrition Biochemstry, 11(3): 128–131.
28. Tonstad, S, And K. L. Smerud. 2002. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. American Journal of Clinical Nutrition, 76(1): 78-84.
29. Yan, C., X. Xu., X. Zou. 2017. The Usage of ACCLUSTER for Peptide Binding Site Prediction. Modeling Peptide-Protein Interactions: Methods and Protocols, 5(1): 3-9.
30. Yang, J ., R. Yan., A. Roy., D. Xu., J. Poisson, And Y. Zhang. 2015.The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nature Methods, 12(1): 7-8.
31. Yamamoto, N., A, And. T. Takano. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from Lactobacillus helveticus CP790, 77(4): 917-22.
32. Zhang , Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics, 9(1): 1-8.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 3, Fall 2020, p. 373-385

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۸۵-۳۷۳

Bioinformatics Analysis of Human Milk Protein and Bioactive Peptides alpha s-1 casein Effect on Inhibiting ACE Enzyme and Comparing to Different Mammalian Species

H. A. Yami[1]- M. Tahmoorespur[2*]- M. Azghandi[1]
Submitted: 23-07-2018
Accepted: 09-11-2019

Introduction: High blood pressure is a dangerous risk factor for cardio-vascular disease, including coronary artery disease and strokes. In the human body, a system called renin-angiotensin system regulates blood pressure, in which the angiotensin converting enzyme ACE plays an important role in increasing blood pressure. Angiotensin I as a converting enzyme (ACE) catalyzes the conversion of angiotensin I to vasoconstrictor angiotensin II, and also inactivates the antihypertensive vasodilator bradykinin. Inhibition of ACE mainly results in an overall antihypertensive effect. Peptides derived from food proteins can have angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting properties. Casein protein in milk or other dairy products such as cheese is a rich source of bioactive peptides. Bioactive peptides are inactive in the main protein sequence and are released in during milk digestion or milk fermentation by proteolytic bacteria or hydrolysis by proteolytic enzymes. Many of these peptides have several biological activities. Casein-derived peptides, such as opioid peptides, antihypertensive peptides, casein phosphopeptides and glycomacropeptides have various physiological roles, including adjusting and lowering blood pressure by inhibiting angiotensin converting enzyme (ACE). Caseocinin peptide has been derived from the casein Alpha S1 protein It has an ACE-inhibiting enzyme inhibitor and low blood pressure.
The purpose of this study was to identify the alpha S1 protein casein and bioactive peptides of the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor in human milk and compare it with different species of mammals.

Materials and Methods: At first, genomic and protein data for eight different species of mammals (cattle, sheep, camels, horses, humans, ewes and pigs) was collected from the National Center for Bioinformatics Information (NCBI). Physico-chemical properties analysis (atomic state, isoelectric point, half-life, hydrophobicity hydrophilicity , barometric and pH) and - Multiple sequence alignment of of alpha-s1 casein and the bioactive peptides of Casokinin in 8 species of mammals was done using CLC Main Workbench 5 software. Then, the prediction of bioactive peptide alpha s1 casein and its three-dimensional structure was done with the help of the online software ACCLUSTER Server, I-TASSER and GalaxyWEB. The simulation of the Molecular interaction (docking) of alpha-s1 casein and the bioactive peptides of Casokinin with angiotensin converting enzyme ACE in the cell was done using ClusPro 2.0 software online.

Results and Discussion: the results of bioinformatics analysis of human milk protein with other mammals showed that camel milk has the most similar physicochemical properties of milk to humans and can be a good alternative to human milk in feeding children. The highest and least percentage of amino acid sequence amino acids in alpha-sec1 casein in different mammals with humans respectively is related to camel and Goat. The results of the determination of the position and energy of the connection show that the most suitable binding location with maximum energy is related to human and camel milk. Among the bioactive peptides identified and predicted in eight species of mammals, due to having more proline amino acid in Caseocinin peptide, the camel milk is more resistant than other species. Therefore, the antihypertensive effect in camel milk is greater than other mammals. According to the results, it can be predicted that three-dimensional structure of protein and peptides will have a great effect on antihypertensive properties and it causes a good interaction with the active site of the angiotensin converting enzyme (ACE) and thus inhibits the ACE enzyme and lowers blood pressure. Investigating the performance of alpha S1 protein casein and Caseocinin peptide identified for eight different species of mammals And comparing its results with human milk in inhibiting ACE enzyme With Molecular interaction (Docking) Protein's Bioinformatics Software showed that milk of camels after human milk

1-Ph.D. student, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
* Corresponding author: m_tahmoorespur@yahoo.com

has the highest performance in Reducing the risk factors for cardiovascular disease such as inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) and blood pressure in preventing the development and progression of cardiovascular disease.

Conclusion: the alpha S1 protein casein and Caseocinin peptide have many biological properties and are very important in the health of the body.It can be said that camel milk is the most similar to human-like physico-chemical properties and It can be a good alternative to human milk in feeding children. The bioactive Caseocinin peptide has pharmaceutical compounds that can be used to treat high blood pressure and heart disease. Therefore, this peptide can be used as superbenefit and natural additives, an appropriate replacement to antihypertensive drugs.

Keywords: alpha s1 casein Protein angiotensin, converting enzyme ACE, molecular interactions.